

原 著

中耳滲出液と真菌

獨協医科大学越谷病院 耳鼻咽喉科

村上 敦史

要 旨

<目的>

滲出性中耳炎の中耳滲出液中にしばしばエンドトキシンが検出される事から、グラム陰性菌の感染の既往が疑われている。一方、好酸球性中耳炎は既往歴に喘息、好酸球の関与は間違いないが、直接の病因はまだ明らかにされていない。近年、慢性副鼻腔炎の起炎微生物として真菌が注目されている。中耳における真菌の関与について検討することとした。

<方法>

好酸球性(8例)及び、非好酸球性滲出性中耳炎(12例)の中耳滲出液、及び鼻汁を採取し、メセナミン銀染色を行ない観察した。一部は電子顕微鏡でも観察した。

<結果>

好酸球性中耳炎、非好酸球性滲出性中耳炎の中耳滲出液中に100%真菌菌糸を検出した。好酸球性中耳炎では8例中7例にCharcot-Leyden crystal (CLCs)を認めた。好酸球性中耳炎の鼓膜状態から重症度分類するとCLCsが多い程、鼓膜状態は良好であった。鼻汁中にも真菌菌糸は100%認められたが、CLCsが検出されたのは、好酸球性中耳炎症例での一例のみであった。

<考察>

中耳滲出液中にメセナミン銀による組織染色で真菌が存在することを初めて明らかにした。両疾患に真菌が関与している可能性は十分考えられ、特に好酸球性中耳炎では鼓膜状態の重症度分類すると、重症度が増すほどCLCsの数が減少するという今回の結果は、好酸球性中耳炎は病因として真菌が重要な役割を演じている事を示唆していると考えられた。

Key Words : 滲出性中耳炎, 真菌, 好酸球性中耳炎, Charcot-Leyden crystal

諸 言

中耳腔と副鼻腔は上気道に直接開口している点で非常に類似性がある。この2つの腔に侵入して感染を引き起こす起炎菌についても類似性が報告されている^{1,2)}。すなわち肺炎球菌、インフルエンザ菌であり、近年モラクセラ・カタラーリスも注目されるようになってきた。これらの病原菌は鼻鼻腔にまず定着して耳管を介して中耳腔に感染し急性中耳炎を発症させ、副鼻腔自然口を介して副鼻腔に感染し急性副鼻腔炎を発症させると考えられ

ている。すなわち鼻咽腔が上気道の感染源と考えられている³⁾。1999年 Ponikau 等⁴⁾により慢性副鼻腔炎だけでなく健常者の鼻汁から真菌がほぼ100%検出されるという報告がなされた。この真菌が好酸球を局所に遊走させ、好酸球性炎症を引き起こすことが慢性副鼻腔炎の原因であると提唱した。先にも述べたが、上気道に開口している中耳腔と副鼻腔では同一の起炎菌により感染が惹起されることを考えると、鼻汁に100%検出される真菌も中耳腔に存在する可能性は大きい。PCR法で中耳滲出液に真菌DNAを証明したとの報告もなされている⁴⁾。もし中耳滲出液中に真菌が存在すれば、病原微生物として中耳で重要な役割を担っている可能性が考えられる。我々は通常の中耳炎及び好酸球性中耳炎患者より採取した中耳滲出液中に真菌がどのぐらいの頻度で検出されるか調べる事にした。

平成22年9月22日受付, 平成22年10月29日受理
別刷請求先: 村上敦史

〒343-8555 埼玉県越谷市南越谷2-1-50
獨協医科大学越谷病院 耳鼻咽喉科

表 1 好酸球性中耳炎

			喘息	真菌 RAST	ステロイド 使用歴	鼓膜穿孔	中耳滲出液		鼻汁	
							菌糸	クリスタル	菌糸	クリスタル
A	①	70 歳 男	+	陰性	+	両側	+	-	+	+
	②	52 歳 女	+	陰性	+	両側	+	0.24/mm ²	+	-
	③	67 歳 女	アスピリン	陰性	+	両側	+	0.25/mm ²	+	-
B	④	57 歳 女	+	アスペルギ ルス+	+	片側	++	0.86/mm ²	+	-
	⑤	73 歳 女	アスピリン	陰性	+	片側	+	1.65/mm ²	++	-
C	⑥	52 歳 女	アスピリン	陰性	+	チューブ 挿入	++	3.71/mm ²	++	-
	⑦	52 歳 女	アスピリン	陰性	+	チューブ 挿入	+	5.43/mm ²	+	-
D	⑧	37 歳 男	-	陰性	-	治癒	+	10.5/mm ²	+	-

A：両側鼓膜が永久穿孔となった B：片側鼓膜が永久穿孔となった C：チューブ挿入にてコントロールできた
D：チューブ抜去が成功した例

対象と方法

好酸球性中耳炎，非好酸球性滲出性中耳炎の中耳滲出液及び鼻汁を採取した。好酸球性中耳炎患者は，8名（男性2名，女性6名，平均年齢57.5才）であった。7名は喘息の既往がありステロイドの大量投与された経験があった。アスピリン喘息患者は8例中4例に認められた。RAST陽性者は1例のみで抗原はアスペルギルスであった。非好酸球性中耳炎患者は，漿液性滲出液患者は7名（男性4名，女性3名，平均年齢51才）で粘液性滲出液患者は5名（男性4名，女性1名，平均年齢15才）であった。滲出液採取時は全例鼓膜穿孔はなかった。好酸球性中耳炎は鼓膜切開後，非好酸球性滲出性中耳炎は穿刺により，滲出液を採取した。採取した中耳滲出液及び鼻汁は一部をプレパラートに塗布し，残りは2%グルタルアルデヒド（0.1 mol/L カコジleitバッファー）で1時間固定した。漿液性中耳炎の滲出液及び水溶性鼻汁は固定液の入ったスピッツに採取し1500 rpmで10分間遠沈し，その沈渣を用いた。0.1 mol/L カコジleitバッファーで3回水洗後オスミウム酸で40分間後固定を行い，エポキシ樹脂に包埋した。大きさ1 mm 平方で厚さ1 μm の切片を作製しプレパラートに張りつけトルイジンブルー染色を行った。任意の5枚の切片を選び1 mm²中に存在するCLCsを数えた。直接プレパラートに塗布した標本はメセナミン銀で1時間染色を施しさらにサフランin-O液で5分染色し400倍で各検体を5

表 2 好酸球性中耳炎の中耳滲出液中の好酸球数

		好酸球数	
A	1	70 歳	25.7
	2	52 歳	18.7
	3	67 歳	13.7
B	4	57 歳	3.3
	5	73 歳	12.3
C	6	52 歳	4.5
	7	52 歳	29.7
D	8	37 歳	41.7

A：両側鼓膜が永久穿孔となった
B：片側鼓膜が永久穿孔となった
C：チューブ挿入にてコントロールできた
D：チューブ抜去が成功した例

視野観察した。5視野中に1つでも真菌が存在すれば+とし，5視野すべてに真菌があれば2+とした。エポキシ包埋したブロックは超薄切片作製後，電子顕微鏡で観察を行った。好酸球数は一片が117 μm のメッシュホールを3000倍で5視野観察した。そして1メッシュあたりの平均個数を測った。（表2）。真菌培養による検査は行わなかった。真菌培養による検出率は検査施設により大きな差が出るようだが，総じて日本で通常行われている方法では検出率は非常に低い。Ponikau⁴⁾は特殊な培養方法で行わないと真菌の検出率は低いと述べている。我々の施設は通常の方法で真菌の検出を行っているので

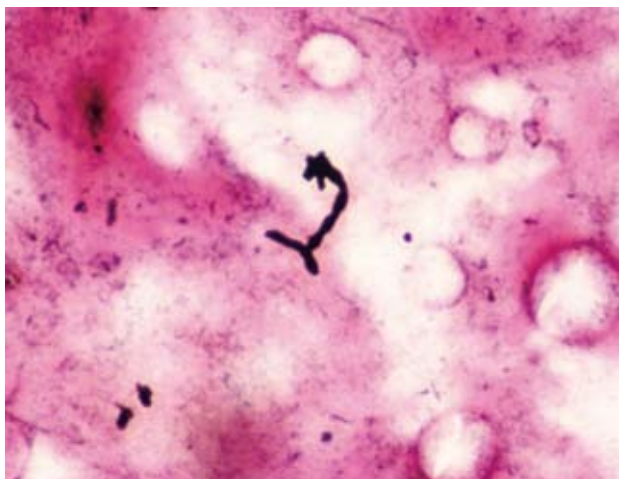


図1 中耳滲出液の塗沫標本
メセナミン銀染色を施すと真菌は黒色に染まる。

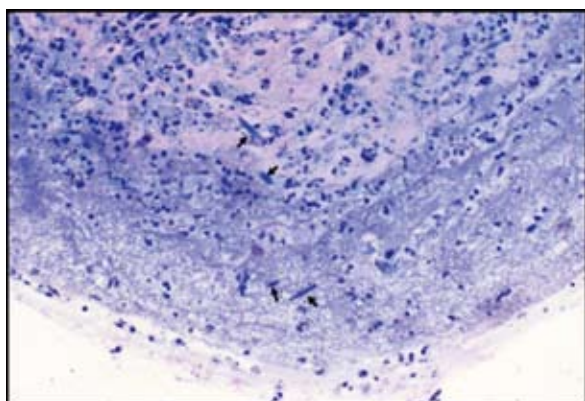


図2 中耳滲出液中の Charcot-Leyden crystals
中耳滲出液をエボンに包埋し、1 μ mに薄切する。矢印が Charcot-Leyden crystals である。

検出率は低い。そこで我々は真菌の検出は鼻汁組織を実際にメセナミン銀染色を施して顕微鏡観察する方法を採用した。

結 果

○好酸球性中耳炎

中耳滲出液のプレパラート塗沫標本で8例全例に真菌菌糸を認めた(表1, 図1)。2症例が2+であり6例は+であった。

エボン包埋し、1 μ mに薄切した切片を観察すると Charcot-Leyden crystal (CLCs) が8例中7例に観察された(表1, 図2)。電子顕微鏡で観察すると CLCs は好酸球の細胞質内にあったものが好酸球の壊死により、破綻した細胞膜部位より好酸球細胞外へ特異顆粒と共に放出されていた(図3, 4)。鼓膜状態での重症度分類を検討してみたところ、症例①—③は滲出液採取時に鼓膜穿

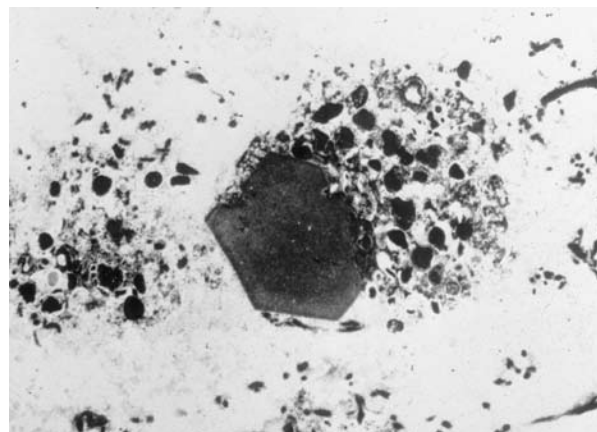


図3 崩壊好酸球中に観察された Charcot-Leyden crystal
好酸球性中耳炎の滲出液中の好酸球はほとんど壊死に陥っている。細胞膜は消失しているが、六角柱の crystal はまだ好酸球細胞質内に認められる。

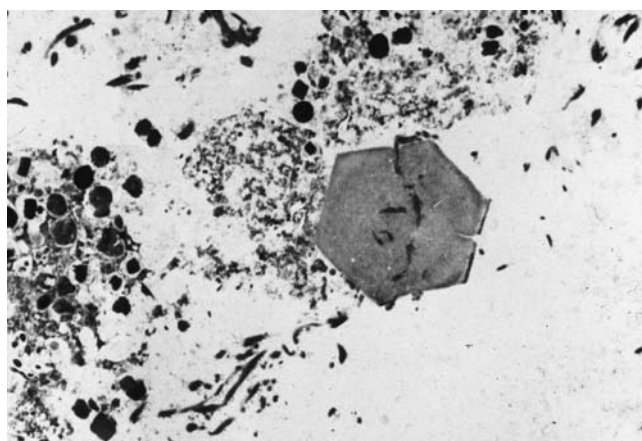


図4 崩壊好酸球から細胞外に放出された Charcot-Leyden crystal

孔が認められなかったが治療経過中に両側鼓膜が永久穿孔となった最重症例である。症例④, ⑤は片側鼓膜が永久穿孔となった重症例である。症例⑥—⑧は鼓膜チューブ挿入により control 可能な軽症例で、⑧はチューブ抜去に成功した治癒症例(最軽症例)である。経過観察中に骨導閾値が上昇した症例はなかった。重症例では、crystal の分布頻度が少なく、軽症例では多数の crystal が観察された。症例⑧は喘息の既往がなく、典型的な好酸球性中耳炎とはいえないかもしれないが、滲出液中には多数の好酸球が認められた。CLCs は 10.5/mm² とその数は最多であった(図5)。この症例は喘息の既往歴がなかったので、過去にステロイドホルモンによる治療歴もなかった。鼻汁の塗沫標本では菌糸の検出率は 100%であったが、鼻汁中に CLCs が観察されたのは8例中1例だけであった(表1)。

遊走した好酸球数は鼓膜状態の重症(症例 A+B)と

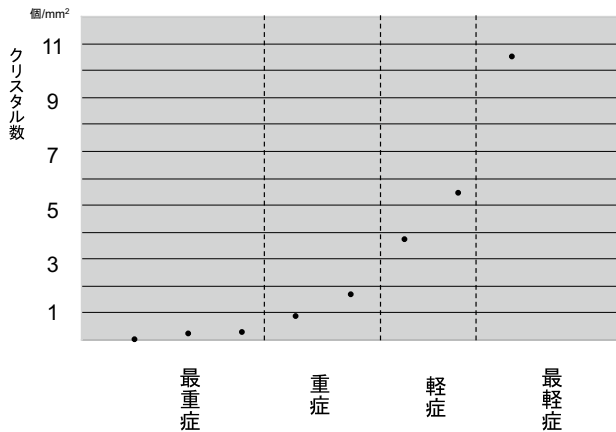


図5 好酸球性中耳炎の重症度と Charcot-Leyden crystal 数
重症度が高くなる程 Charcot-Leyden crystal の数は少ない。

軽症 (症例 C+D) で有意差は認めなかった (スチューデントの t 検定)。また今回の検討では好酸球数とクリスタル数には有意な相関は認められなかった (ピアソン相関係数の検定)。

○非好酸球性滲出性中耳炎

滲出液が漿液性であった7例は年齢が18才～75才であり幼児例はなかった。粘液性滲出液の5例は1例が51才であったが他の4例は6才以下の幼児であった。プレパレート塗沫標本でメセナミン銀染色による真菌菌糸の検出率は漿液性、粘液性ともに100%であった。しかしCLCsは全例で検出できなかった。

鼻汁塗沫標本にメセナミン銀染色を施して観察した結果は、真菌菌糸は100%の検出率であった。非好酸球性滲出性中耳炎患者の鼻汁中にCLCsは観察できなかった。

考 察

滲出性中耳炎の中耳滲出液を培養して細菌が検出される事は稀である。しかし、滲出液中にエンドトキシンがしばしば検出される事により、グラム陰性菌のインフルエンザ菌の感染症が疑われている。しかし、細菌感染以外の病原微生物の可能性も否定できない。真菌は副鼻腔炎の病原微生物として注目されている。Kim等⁸⁾によれば培養では中耳浸出液中に真菌を証明できなかったが、PCR法で中耳滲出液中の34%に真菌DNAを検出したと報告している。鼻汁においても慢性副鼻腔炎と正常者で真菌をPCR法で検出した結果が報告されている¹⁴⁾。その報告によると副鼻腔炎患者鼻汁からは真菌DNAが42%、正常者では40%検出されたとしている。Ponikau⁴⁾によれば、慢性副鼻腔炎および正常者の鼻汁から

は、ほぼ100%真菌が検出されているので、中耳滲出液に真菌DNAが34%検出されたという結果はPonikauの方法で検出すれば、中耳滲出液にもほぼ100%真菌が検出される事が推定される。何故なら鼻汁におけるPCR法による真菌の検出率もCatten等¹⁴⁾によれば中耳滲出液とほぼ同じで40%と報告されているからである。

従って、今回の我々の組織学的検出法で真菌を100%証明できたという結果は十分理解できる結果と考えられる。今回中耳腔より真菌を検出したのは、滲出液のある病的中耳腔である。中耳病変のない正常中耳に真菌を検出できるかは不明である。正常中耳には滲出液が貯留していないので、検査する材料の採取は難しい。中耳を洗浄した液の沈渣を調べれば正常中耳に真菌が常在するか明らかになったかもしれない。中耳滲出液採取時に外耳道に存在した真菌が混入した可能性は否定できないが、採取前に外耳を生食水で洗浄した後に細心の注意を払って採取したので、その可能性は低いと考える。また染色液を調べたが真菌は検出されなかった。中耳滲出液中にメセナミン銀染色により真菌を100%世界で初めて証明した。100%検出された事は将来、真菌が滲出性中耳炎の起炎微生物として重要な位置をしめる可能性は十分にあると考える。真菌が中耳に侵入する経路は、採取した中耳滲出液はすべて鼓膜に穿孔のない患者から採取したものである事を考えると、耳管経由で中耳に入ってきたと考えるのが妥当であろう。中耳腔と外気圧の関係で、鼻咽腔から中耳腔に向かう気流の流れに乗って真菌が中耳腔に侵入したものと考える。鼻腔に100%真菌が証明される事を考えるとおそらく鼻咽腔にも真菌は高率で存在するものと思われる。しかし細菌やウイルスに比較し、真菌のサイズは桁外れに大きいので私は中耳腔への侵入は、容易ではないと考えていた。しかし、実際には滲出液中に100%検出されたという事は真菌が鼻咽腔に多数存在する証拠とも考えられる。

Ponikau⁴⁾によれば鼻汁中の真菌が好酸球を鼻汁中に遊走させ、好酸球性炎症を副鼻腔に引き起こすと説明している。もしこの説が正しければ、中耳腔に侵入した真菌が中耳の炎症を引き起こす事は十分に考えられる。しかし、通常の滲出性中耳炎の中耳滲出液中には好酸球は遊走して来ない。もし好酸球性中耳炎にのみ真菌が存在するとすれば、真菌が好酸球を遊走させるというPonikauの考えは魅力的である。通常の滲出性中耳炎と比較すれば好酸球性中耳炎は極く稀な疾患であり、真菌が滲出性中耳炎の病原微生物として何らかの役割を担っていると説明するにはさらに別のファクターが付け加わらなければ説明できないと考える。

CLCsは両端が尖った六角柱の結晶である。CLCsは

種々の好酸球性炎症の存在する部位で観察される。アレルギー性真菌性副鼻腔炎^{5,6)}、木村氏病⁷⁾、喘息⁹⁾等で報告がある。CLCsはlypophospholipase 活性¹⁰⁾を示す17400 Daの蛋白から作られる。CLC蛋白は核のeu-chromatin部位と細胞質部位に多く含まれている。そしてCLC蛋白は細胞質内で徐々に結晶化しCLCsとなると言われている¹¹⁾。一方好酸球の細胞崩壊時に細胞外に放出されたCLC蛋白はマクロファージに取り込まれ、phagosome内で結晶化した後CLCsとなって組織間際にマクロファージから放出されるという説¹²⁾もある。しかし、今回電子顕微鏡でCLCsが崩壊した好酸球から直接放出される像を観察する事が出来た。従ってマクロファージからの放出を否定は出来ないが、中耳滲出液中に観察されたCLCsは好酸球から直接放出されたものと断定してよいと考える。CLCsの病理的役割については未だ不明であるが、CLC蛋白はマウスでは肺での炎症の関与¹³⁾や寄生虫に対する防禦作用¹¹⁾などが推察されている。また真菌感染に引き続いてクリスタルが形成される事から真菌に対する防禦作用も推察されている。

今回の8例は全症例初診時には鼓膜穿孔のない新鮮例であった。全例に鼓膜切開を施し、その際に中耳に貯留していたニカワ状の貯留物を採取した。採取後に鼓膜チューブを挿入した。鼓膜状態の重症度分類で軽症例の3例は鼓膜チューブが閉塞する事なく2-3週間に1度の清掃で中耳腔への換気は比較的良好であり、1例は治癒し最終的にチューブ抜去できた。しかし、残りの5例は鼓膜チューブはすぐに閉塞してしまい、長い治療経過後、結局永久鼓膜穿孔が出来てしまった。両側に永久鼓膜穿孔が出来たものを最重症例に、片側のみ永久鼓膜穿孔が出来たものを重症例とした。CLCsの単位面積あたりの数は最重症は、0.16個/mm²(0, 0.24, 0.25)、最軽症例は10.5個/mm²と鼓膜状態の重症度が高いほどCLCsは少なくなる事が明らかになった(図5)。CLCsが真菌に対する防禦作用を持っているとすると、今回の結果は、CLCsが抗真菌作用を発揮して好酸球性炎症の重症化を防いでいる可能性を示唆している。Katzenstein等⁶⁾はallergic fungal sinusitis (AFS)の鼻汁のallergic mucinの中に高頻度にCLCsが認められる事を報告しているが、今回の好酸球性中耳炎患者の鼻汁からは1例以外はCLCsは検出されなかった。AFSの全例に鼻汁中にCLCsが検出されるわけではないが、好酸球性中耳炎患者が必ずしもAFSではない可能性が示唆される。非好酸球性滲出性中耳炎患者の鼻汁中には好酸球はないので、好酸球由来のCLCsは真菌は検出されても全く検出されなかった。好酸球性炎症である鼻アレルギーの鼻汁中にも崩壊した好酸球は多数認められるが¹⁵⁾、CLCsの

検出率はきわめて低い。鼻腔においては好酸球性炎症でも真菌が関与した時のみ高頻度にCLCsが検出される事を考えると、好酸球性中耳炎の中耳滲出液中に100% CLCsが検出されたという事は、好酸球性中耳炎の病原微生物として真菌の関与が強く疑われる。好酸球性中耳炎8例中7例は喘息の既往があり、過去に大量のステロイドホルモンの使用歴がある。ステロイドの大量使用により真菌の中耳への定着率が増した可能性は否定できない。

文 献

- 1) Rosenblut A, Santolaya ME, Gonzalez P, et al : Bacterial and viral etiology of acute otitis media in Chilean children. *Pediatr Infect Dis J* **20** : 501-507, 2001.
- 2) Brook I : Microbiology and antimicrobial management of sinusitis. *J Laryngol Otol* **119** : 251-258, 2005.
- 3) Faden H, Duffy L, Wasielewski R, et al : Relationship between nasopharyngeal colonization and the development of otitis media in children. *Tonawanda/Williamsville Pediatrics. J Infect Dis* **175** : 1440-1445, 1997.
- 4) Ponikau JU, Sherris DA, Kern EB et al : The diagnosis and incidence of allergic fungal sinusitis. *Mayo Clin Proc* **74** : 877-884, 1999.
- 5) Gourley DS, Whisman BA, Jorgensen NL et al : Allergic Bipolaris sinusitis : clinical and immunopathologic characteristics. *J Allergy Clin Immunol* **85** : 583-591, 1990.
- 6) Katzenstein AA, Sale SR, Greenberger PA : Allergic Aspergillus sinusitis : a newly recognized form of sinusitis. *J Allergy Clin Immunol* **72** : 89-93, 1983.
- 7) Kuo TT, Shih LY, Chan HL : Kimura's disease, Involvement of regional lymph nodes and distinction from angiolymphoid hyperplasia with eosinophilia. *Am J Surg Pathol* **12** : 843-854, 1988.
- 8) Kim EJ, Catten MD, Lalwani AK : Detection of fungal DNA in effusion associated with acute and serous otitis media. *Laryngoscope* **112** : 2037-2041, 2002.
- 9) Kraft M, Bettinger CM, Wenzel SE et al : Methacholine challenge does not affect bronchoalveolar fluid cell number and many indices of cell function in asthma. *Eur Respir J* **8** : 1966-1971, 1995.
- 10) Weller PF, Bach D, Austen KF : Human eosinophil lysophospholipase : the role protein component of charcot-Leyden crystals. *J Immunol* **128** : 1346-1349, 1982.
- 11) Calafat J, Janssen H, Knol EF et al : Ultrastructural

- localization of charcot-Leyden crystal protein in human eosinophils and basophils. *Eur J Haematol* **58** : 56-66, 1997.
- 12) Lao LM, Kmakiri M, Nakagawa K et al : The ultrastructural findings of Charcot-Leyden crystals in stroma of mastocytoma. *J Dermatol Sci* **17** : 198-204, 1998.
- 13) Guo L, Johnson RS, Schuh JC : Biochemical characterization of endogeneously formed eosinophilic crystals in the lungs of mice. *J Biol Chem* **275** : 8032-8037, 2000.
- 14) Catten MD, Murr AH, Goldstein JA et al : Detection of fungi in nasal mucosa using polymerase chain reaction. *Laryngoscope* **111** : 399-403, 2001.
- 15) Watanabe K, Misu T, Inoue S et al : Cytolysis of eosinophils in nasal secretions. *Ann otol Rhinal Laryngol* **112** : 169-173, 2003.

The Middle Ear Effusion and Fungus

Atsushi Murakami

Department of Otolaryngology, Dokkyo Medical University Koshigaya Hospital

(Objectives)

It is rare to detect the bacillus and the virus in the middle ear effusion of otitis media with effusion. But the past of infection of Gram-negative bacteria is doubted as the endotoxin is detected in the middle ear effusion. The direct etiology of eosinophilic otitis media is uncertain although this disease is sure to have the relation to eosinophilic leukocyte because of the previous history of asthma or eosinophilic sinusitis.

(Methods)

The middle ear effusions and nasal secretions were gathered, from 8 patients of eosinophilic otitis media and 12 patients of otitis media with effusion. They were observed by light microscope after staining of the methenamine silver and some of them were observed with the electron microscope.

(Results)

The fungal hyphae were detected by 100% in both middle ear effusions of eosinophilic otitis media and otitis media with effusion. The Charcot-Leyden crystals (CLCs) were

detected by 7 middle ear effusions of 8 patients with eosinophilic otitis media.

The more the number of CLCs was detected, the more excellent the prognosis was.

Although the fungal hyphae were also detected in all nasal secretions, CLCs were detected only one case of eosinophilic otitis media.

(Discussion)

Although it is uncertain whether fungus is detected in normal person's middle ear, the possibility that fungus takes part in the both disease is large. In the result that the number of CLCs decrease by the increase of the severity of eosinophilic otitis media, fungus is thought to be one of the etiologies of eosinophilic otitis media as it is reported that CLCs in the fungal infection with the increased eosinophilic leucocytes were frequently observed.

Key Words : otitis media with effusion, fungus, eosinophilic otitis media, Charcot-Leyden crystals